

## Referenties

1. Ruineman-Koerts JG, Boonstra JG, Klasen IS, Zweegman S, Minnema MC, Wegman JJ, et al. Laboratoriumonderzoek bij monoklonale gammopathie: detectie van monoklonale immuunglobulinen. *Ned Tijdschr Hematol.* 2011; 8: 160-168.
2. Hoffbrand AV, Moss PAH, Pettit JE. *Essential Haematology*, 5th ed. Blackwell Publishing Professional. 2006: 218 pp.
3. Kyle RA. Multiple myeloma: review of 869 cases. *Mayo Clin Proc.* 1975; 50: 29-40.
4. Jones HB. *Chemical Pathology.* *Lancet.* 1847; 2: 88-92.
5. Merlini G, Aguzzi F, Whicher J. Monoclonal gammopathies. *J Int Fed Clin Chem.* 1997; 9: 171-176.
6. Passing H, Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in clinical chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983; 21: 709-720.
7. Brinkman JW, Ijpelaar DHT, Schrandt-van der Meer AM, Jonkers GJPM, Beijer C. Het gebrek aan sensitiviteit en specificiteit van de totaaleiwitbepaling voor de detectie van monoklonale vrije lichte ketens in urine. *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk.* 2011; 36: 11-15.

*Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk* 2012; 37: 219-221

## Verbeterde Cushing speekseldiagnostiek m.b.v. eigen UPLC MS/MS methode die onderscheid maakt tussen cortison en cortisol

A.K. BOER<sup>1</sup>, D. van den HEUVEL<sup>1</sup> en E. LENTJES<sup>2</sup>

De afgelopen jaren heeft de middernacht speekselcortisol zijn intrede gedaan in de Cushing diagnostiek. Twee meta-analyses van meer dan 10 studies laten zien dat speekselcortisol een zeer betrouwbare marker is voor het syndroom van Cushing met een sensitiviteit van minstens 92-96% en een specificiteit van 88-96% (1, 2). In de richtlijn van bijvoorbeeld de Endocrine Society heeft de middernachtspeekselcortisol dan ook een prominente plaats gekregen (3). Groot nadeel is dat deze studies en richtlijnen gebaseerd zijn op immunologische cortisol bepalingen die sterk kruisreageren met cortisol precursors en metabolieten. Er zijn bijvoorbeeld commerciële cortisolbepalingen die kruisreageren met cortison, wat kan oplopen tot 31% (4). Wij hebben een massaspectrometrische bepaling opgezet die zeer specifiek onderscheid maakt tussen cortisol en cortison.

### Methode

Aan dit onderzoek hebben 268 patiënten, voor wie een plasmacortisol was aangevraagd, en 25 laboratoriummedewerkers vrijwillig geparticipeerd en zij hebben gedurende 1 minuut gekauwd op een synthetisch watje van een Salivette (Sarstedt, 51.1534.500). Daarnaast zijn 57 middernacht speeksels geanalyseerd van (pseudo) Cushing patiënten met zowel een immunologische (RIA, UMCU) als massaspectrometrische techniek. De salivettes werden ingevroren (-20°C) tot

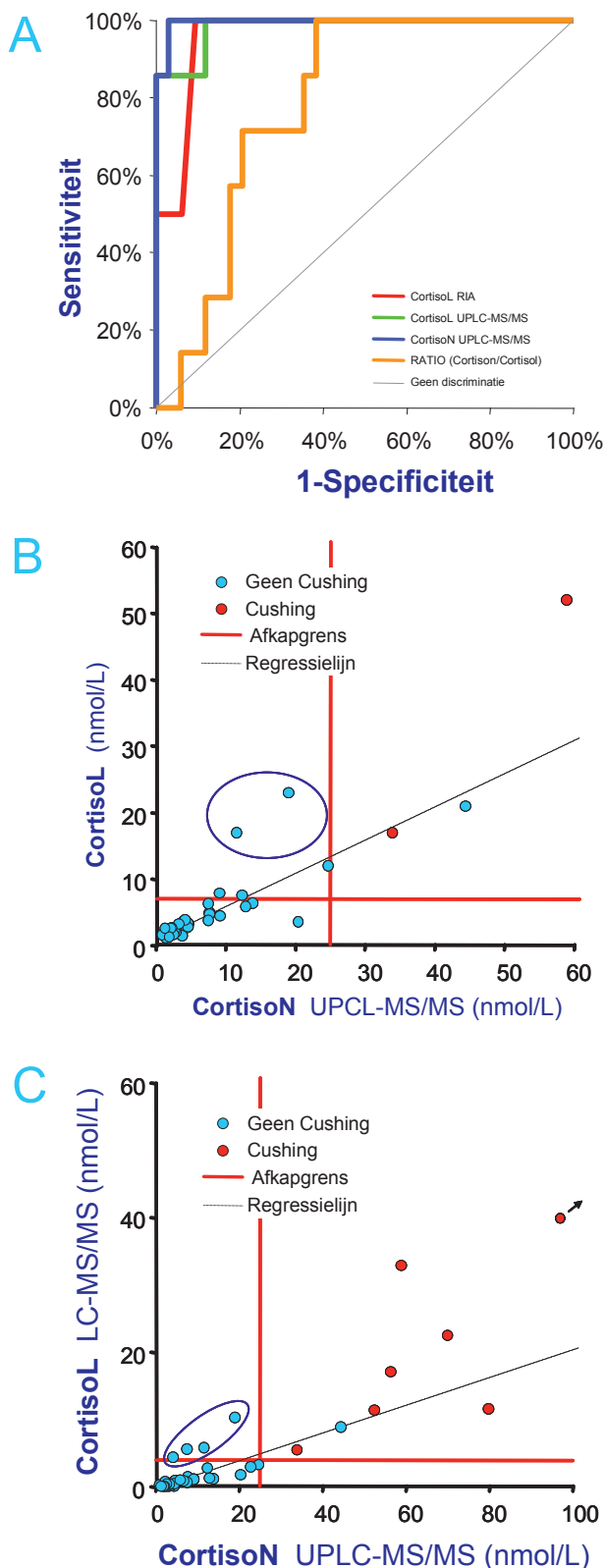
analyse. Na ontdooien werd 250 µl speeksel met 25 µl interne standaard (10 µg/L D<sub>4</sub>-cortisol (Sigma Aldrich 705594) in methanol/H<sub>2</sub>O (50%/50%)) geëxtraheerd met dichloormethaan middels 30 seconden vortexen. Na afdraaien (10 minuten, 2682g, 21°C) werd het supernatant en interface verwijderd. De dichloormethaan werd onder stikstof drooggedampt (37°C). Het residu werd opgelost in 100 µl methanol/H<sub>2</sub>O (50%/50%) en 30 seconden gevortext. Na centrifugeren (2 minuten, 490g, 21°C) werd 15 µl geïnjecteerd op een Waters Acquity UPLC MS/MS systeem en gescheiden middels een gradiënt (methanol H<sub>2</sub>O (+0,1% mierenzuur en 2 mmol/l ammoniumacetaat) van 45/55% naar 2/98%). Met behulp van een ijkreeks en de interne standaard (MRM 367,10 → 121,1), werden de massaovergangen van cortisol en cortison (respectievelijk 363,15 → 120,98 en 361,05 → 162,86) gekwantificeerd.

### Resultaat

De opgezette LC MS/MS methode voor cortisol en cortison is zeer specifiek omdat enerzijds de UPLC de componenten chromatografisch scheidt en anderzijds de MS kijkt naar specifieke massaovergangen. Cortisol en cortison hebben als retentietijd respectievelijk 1,15 en 1,00 minuten en zijn volledig basislijn gescheiden. Zonder de chromatografische scheiding zal een natuurlijke isotoop van cortison in de massaovergang van cortisol worden meegenomen. Bij de middernachtspeeksels differentieert speekselcortison beter tussen onbehandelde Cushingpatiënten (n=7) en (maligne) hypertensiepatiënten (n=34) dan speekselcortisol (figuur 1). De optimale afkapgrens voor middernachtcortisol ligt bij <5 nmol/l en voor cortison bij <25 nmol/l (zie tabel 1). Voor cortisol ligt dit halverwege het referentie-interval, waardoor de specificiteit

*Algemeen Klinisch Laboratorium Catharina Ziekenhuis (CZE)<sup>1</sup>, Eindhoven en Lab Klinische Chemie en Haematologie, Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU) locatie WKZ<sup>2</sup>, Utrecht*

E-mail: Arjen\_Kars.Boer@cze.nl



**Figuur 1.** Klinische validatie van speekselcortisone en speekselcortisol.  
 A) ROC curven van de Cortisol (RIA (UMCU, Utrecht) (rood) en UPLC MS/MS (groen, CZE)), cortisone (UPLC MS/MS, donker blauw) en de ratio tussen cortisone en cortisol (oranje). De curven zijn gebaseerd op 41 middernacht speeksel van 34 pseudo-Cushing patiënten (rode cirkels) en 7 Cushing patiënten (blauwe cirkels). De individuele concentraties van B) cortisol (RIA, UMCU) en C) cortisone (UPLC MS/MS) zijn uitgezet tegen de cortisone concentratie (UPLC MS/MS). De foutpositieven zijn met een blauwe ellips omcirkeld.

beperkt is (88%). Voor cortisol ligt de afkappgrens buiten het referentie-interval waardoor de specificiteit hoger is (97%). Een vergelijkbaar onderscheid wordt gezien tussen de ochtendwaarden met en zonder 1 mg dexamethason (tabel 1). De concentratiebereiken van speekselcortisol overlappen bij 1,9 nmol/l. De concentratiebereiken van cortisone zijn beter gescheiden. De ondergrens zonder dexamethason ligt bij 13,3 nmol/l en de bovengrens met dexamethason ligt bij 6,5 nmol/l. Tussen de verzamelde speeksel zaten geen ochtendspeeksel van Cushing-patiënten, waardoor een afkappgrens niet kon worden bepaald.

### Discussie

Ondanks het relatief beperkte aantal patiënten in de klinische validatie, laat deze studie wel zien dat in circa 10% van de gevallen er sprake is van een foutpositieve speekselcortisol (weergegeven als blauwe ellipsen in figuur 1B en 1C). Wanneer de cortisol wordt gemeten met een RIA die grotendeels kruisreageert met cortisone, wordt dit beperkt tot circa 5%. De speekselcortisol is slechts in één geval foutpositief (2,4%). In dit geval had de aanvragende arts grote twijfels of de desbetreffende puber inderdaad een middernachtspeeksel had ingeleverd of toch stiekem een ochtendspeeksel. We hebben niet gecontroleerd of de patiënten voorafgaand aan de speekselverzameling hebben gegeten of gerookt. Van roken en voedingscomponenten die glycyrrhizinezuur bevatten (drop, zoethout etc.) is bekend dat de werking van het enzym 11 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase type 2 inhibeert en daarmee de omzetting van speekselcortisol naar speekselcortisone remt (3). Mogelijk verklaart dit het aantal vals positieve speekselcortisol uitslagen. De gevonden afkappgrens voor speekselcortisol van 5 nmol/l is lager dan die afkappgrens van de door ons gebruikte RIA (7 nmol/l), maar het is bekend dat massaspectrometrische technieken circa 40% lager meten dan bindingsassays (3). De huidige literatuur over de rol van speekselcortisol in de Cushing diagnostiek is feitelijk beperkt tot enkele artikelen. Pergogamvros et al beschrijven dat cortisone wel eens een meerwaarde zou kunnen hebben, met name wanneer de CBG-concentratie wordt verstoord, zoals bij anticonceptiva en obesitas (5). In

**Tabel 1.** Referentiewaarden van cortisone en cortisone in speeksel in nmol/l.

Tijdstip	Speekselcortisol	Speekselcortisone	n
23:00 - 00:00	0,1 - 9,0	1,3 - 23,8	59
23:00 - 00:00 uitsluiten Cushing	< 5	< 25	34 + 7
07:00 - 09:00	1,9 - 26,6	13,3 - 57,3	74
07:00 - 09:00 na dexamethason	<0,02 - 1,9	0,4 - 6,5	26

Weergegeven zijn de 2,5<sup>e</sup> en 97,5<sup>e</sup> percentielen zoals bepaald met UPLC MS/MS. De afkappgrens voor het uitsluiten van hypercortisolisme (Cushing) is bepaald met een ROC curve (figuur 1) op basis van 34 pseudo-Cushing patiënten en 7 Cushing patiënten.

een opinion-paper over dit onderzoek beschrijven Raff en Findling dat zij speekselcortison echter niet superieur vinden aan speekselcortisol (6). Een experimentele onderbouwing wordt niet gegeven, maar de studies die zij zelf met speekselcortisol hebben gepubliceerd zijn uitgevoerd met een immunologische RIA. Om hun mening te kunnen toetsen is het dus belangrijk om te weten in welke mate hun RIA kruisreageert met cortison. Van de RIA die wij hebben gebruikt is bekend dat de antistof sterk kruisreageert met cortison. Het is dan ook verklaarbaar waarom onze cortisol-RIA qua scheidend vermogen precies tussen de speekselcortisol en speekselcortison zit die zijn bepaald met onze LC-MS/MS techniek.

### Conclusie

Non invasieve speekseldiagnostiek is een belangrijke additioneel hulpmiddel om hypercortisolisme te kunnen diagnostiseren. Hierbij is het wel essentieel om onderscheid te maken tussen speekselcortison en speekselcortisol. Een massaspectrometrische techniek die onderscheid maakt tussen cortisol en cortison is derhalve superieur aan de huidige immunologische speeksel cortisolbepalingen.

Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk 2012; 37: 221-222

## Measuring LDL-cholesterol: are we doing it wrong?

L. van der HEUL - NIEUWENHUIJSEN<sup>1</sup>, S. STEK<sup>1</sup>, M. TAX<sup>2</sup>, F. VERHEIJEN<sup>1</sup> and H.J.VERMEER<sup>1</sup>

High levels of low density lipoprotein cholesterol (LDL) are correlated with atherosclerosis and coronary heart disease (CHD) (1). Therapy is based upon decreasing LDL levels < 2.5 mmol/L in patients with CHD. Statin therapy reduces LDL and is associated with a statistically significant reduction in the risk of primary and secondary cardiovascular events (2-7). LDL can be measured with several methods i.e. by ultracentrifugation, by direct enzymatic measurement and by Friedewald calculation (8). According to most literature studies, LDL cannot accurately be estimated from the Friedewald equation at triglyceride concentration exceeding 4.52 mmol/L (400 mg/100 ml). Important to realize is, that these studies are based upon the comparison of the Friedewald equation to the reference method of ultracentrifugation. Most Dutch laboratories, however, estimate LDL by

### Referenties

- 1 Carroll T, Raff H, Findling JW. Late night salivary cortisol for the diagnosis of Cushing's syndrome: a meta analysis. *Endocr Pract.* 2009; 15: 335-342.
- 2 Elamin MB, Murad HB, Mullan R, et al. Accuracy of diagnostic tests for Cushing's syndrome: a systematic review and metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 1553-1562.
- 3 Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline, *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93: 1526-1540.
- 4 Kruisreactiviteiten van cortisol bindingsassays tegen cortison zoals gespecificeerd door Siemens voor ADVIA Centaur 31,1% en Roche voor de Cobas/Modular/Elecsys 0,3%.
- 5 Perogamvros I, Keevil BG, Ray DW, Trainer PJ. Salivary cortisone is a potential biomarker for serum free cortisol. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 4951-4958.
- 6 Raff H, Findling JW. Salivary cortisol or cortisone? *Nat Rev Endocrinol.* 2010; 12: 658-660.

Friedewald equation using cut-off levels of triglycerides differing from 2.0 to even 9.0 mmol/L. In this short communication, we discuss the limitations of the triglyceride concentrations currently used in our laboratory to calculate LDL with the Friedewald equation.

### Methods

We anonymously screened 362 patients who were routinely checked for LDL. Patient samples were categorized in 3 groups having triglyceride concentrations <2 mmol/L (n=100), triglycerides between 2 and 7 mmol/L (n=234) and triglycerides >7 mmol/L (n=28). Fasting blood samples were taken from patients visiting the department of clinical chemistry of the Albert Schweitzer hospital. In our routine practice, LDL is estimated from total cholesterol, HDL and triglycerides up to 4.5 mmol/L using the Friedewald formula. For this study we measured direct LDL using enzymatic methods and reagents (Olympus LDL cholesterol OSR6183, Beckman Coulter) and estimated LDL in patient samples with triglycerides up till 15 mmol/L. All measurements were performed on an Olympus AU2700 automatic analyzer (Beckman Coulter) and were calibrated using matching standards

*Department of Clinical Chemistry, Albert Schweitzer Hospital<sup>1</sup>, Dordrecht and Department of Clinical Chemistry, Reinier de Graaf Hospital<sup>2</sup>, Delft, the Netherlands*

E-mail: l.vanderheul@asz.nl